

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003799

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-063071
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 6 3 0 7 1
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

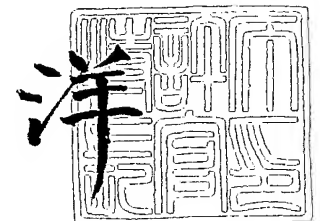
J P 2 0 0 4 - 0 6 3 0 7 1

出 願 人 プリマハム株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004P2013
【提出日】 平成16年 3月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 秋元 政信
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 金井 聡
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 加藤 重城
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 浪岡 真
【特許出願人】
 【識別番号】 000113067
 【氏名又は名称】 プリマハム株式会社
 【代表者】 貴納 順二
【代理人】
 【識別番号】 100107984
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 廣田 雅紀
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102255
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小澤 誠次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100118957
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岡 晴子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100123168
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120086
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 044347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9701840

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを併用することを特徴とする卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 2】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する 2 以上のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 3】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボアルブミンモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 4】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボムコイドモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 5】

食品中の未変性オボアルブミン及び／又は変性オボアルブミンが、1.0～10.0 ppb の濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 6】

食品中の未変性オボムコイド及び／又は変性オボムコイドが、10～100 ppb の濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項 1、2 又は 4 記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項 7】

未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを備え、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と変性卵白アレルゲンとを認識するモノクローナル抗体とを併用する条件下で用いられることを特徴とする卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項 8】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する 2 以上のモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする請求項 7 記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項 9】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボアルブミンモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項 10】

未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボムコイドモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項 11】

異なるエピトープを認識する 2 以上のモノクローナル抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7～10 のいずれか記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項 12】

未変性オボアルブミンを認識する 1 又は 2 以上のモノクローナル抗体及び変性オボアルブミンを認識する 1 又は 2 以上のモノクローナル抗体、並びに、オボムコイドを認識する 2 以上のモノクローナル抗体を備えることを特徴とする請求項 7～11 のいずれか記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】卵白アレルギーの検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、食品等の試料中に含まれる未変性又は変性のオボアルブミンやオボムコイドの卵白アレルギーを定性的かつ定量的に高感度で分析することができる、オボアルブミン及び／又はオボムコイドを指標とした卵白アレルギーの検出方法や、それに用いられる卵白アレルギーの検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

自然環境の減少、車や工場などからの排気ガス、住宅事情等、或いは食べ物の変化など様々な因子により、現在では、3人に1人が何らかのアレルギー疾患をもつといわれている。特に、食物アレルギーは、食品中に含まれるアレルギー誘発物質（以下、食物アレルギーという）の摂取が引き起こす有害な免疫反応であり、皮膚炎、喘息、消化管障害、アナフィラキシーショック等を引き起こし、このような食物アレルギーの患者が増加していることから、医学上及び食品産業上、深刻な問題を生じている。これらの危害は死に至らせることがあり、未然に処置を施す必要がある。そのためには、表示を通じて消費者へ情報提供の必要性も高まっており、FAO/WHO合同食品規格委員会は、アレルギー物質として知られている8種の原材料を含む食品にあっては、それを含む旨の表示について合意し、加盟国で各国の制度に適した表示方法を検討することとした（1999年6月）。日本では過去の健康危害などの程度、頻度を考慮して重篤なアレルギー症状を起した実績のある24品目の食品について、その表示方法が定められた（2002年4月より施行）。アレルギーを引き起こす食品としては、卵類、牛乳類、肉類、魚類、甲殻類及び軟体動物類、穀類、豆類及びナッツ類、果実類、野菜類、ビール酵母若しくはゼラチンなどが知られており、特に卵白アレルギー成分としては、オボアルブミンとオボムコイドが知られている。

【0003】

従来、例えば、卵の同定、定量に関しては、オボムコイドを指標として、すでにポリクローナル抗体を用いた方法（例えば、非特許文献1参照）あるいはモノクローナル抗体を用いた方法（例えば、非特許文献2参照）が知られている。また、オボムコイドを認識するモノクローナル抗体で、未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、及び未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体を用いて、加熱変性状態をも識別してオボムコイドを定量し、卵アレルギーの同定と正確な定量を可能とする免疫学的定量方法が報告されている（例えば、特許文献1参照）。

【0004】

また、食物アレルギー患者のIgE抗体が認識する未変性及び／又は変性物質からなる複数の食物アレルギーの混合物、これら未変性及び変性物質からなる複数の食物アレルギーの混合物を動物に免疫して得られるポリクローナル抗体、これらポリクローナル抗体を用いる食物アレルギーの免疫学的な検出方法が知られている（例えば、特許文献2）。また、上記検出方法に加えて、精製抗原より得られたポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法が公定法として用いられている。これらの食物アレルギー混合物の検出方法は、特異的にアレルギーを検出するために有効な方法であるが、問題としては、前者は複合抗原を用いているため、何に対する抗体なのかが不明であり、例えば、イムノブロット法などによる抗原の同定ができず、非特異的な反応が見受けられる。また、後者では、抗原が精製されているため抗体の特異性は明確であるものの、変性／未変性による抗体結合の違いがあり、食品ごとの前処理方法を検討しなければならず（標準曲線に用いる抗原を全食品で一定にして測定することは不可能であり、食品ごとに想定される抗原の変性程度を把握し、標準曲線に用いる抗原の調製をしなければならない。）、検出される濃度が正確

に測定できるとは限らない。

【0005】

【特許文献1】特開2002-253230号公報

【特許文献2】特開2003-155297号公報

【非特許文献1】Int. Archs. Allergy appl. Immun., 75, 8-15, 1984

【非特許文献2】Nutr. Sci. Vitaminol. 45, 491-500, 1999

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、卵白アレルゲンを含む食品において、卵白アレルゲンが変性／未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、精製オボアルブミンに対するモノクローナル抗体（以下「MA b」ということがある）を作出し、その中から未変性抗原に結合できるMA bと、変性抗原に結合できるMA bとをそれぞれ複数選択し、未変性抗原結合MA b群と変性抗原結合MA b群を組み合わせることで、抗原となるオボアルブミンが変性／未変性のいかなる状態にあっても高感度で検出できることを見出し、特に未変性抗原結合MA b群と変性抗原結合MA b群を組み合わせる用いた場合、未変性オボアルブミンあるいは変性オボアルブミンのみが存在する場合であっても、未変性抗原結合MA b（群）単独使用や変性抗原結合MA b（群）単独使用におけるよりも優れた検出感度で検出しうることを確認した。また、もう一つの卵白アレルゲンである、オボムコイドに対するMA bを組み合わせることにより、食品中の卵白がいかなる加工工程を経た場合にでも、本発明による検出方法や検出キットを利用する者がより簡便に検査対象製品からの卵白アレルゲンを検出しうることを確認した。以上の知見に基づいて本発明は完成するに至ったものである。

【0008】

すなわち本発明は、（1）未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを併用することを特徴とする卵白アレルゲンの検出方法や、（2）未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする上記（1）記載の卵白アレルゲンの検出方法や、（3）未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボアルブミンモノクローナル抗体であることを特徴とする上記（1）又は（2）記載の卵白アレルゲンの検出方法や、（4）未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボムコイドモノクローナル抗体であることを特徴とする上記（1）又は（2）記載の卵白アレルゲンの検出方法や、（5）食品中の未変性オボアルブミン及び／又は変性オボアルブミンが、1.0～10.0ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする上記（1）、（2）又は（3）記載の卵白アレルゲンの検出方法や、（6）食品中の未変性オボムコイド及び／又は変性オボムコイドが、10～100ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする上記（1）、（2）又は（4）記載の卵白アレルゲンの検出方法に関する。

【0009】

また本発明は、（7）未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを備え、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを併用する条件下で用いられることを特徴とする卵白アレルゲン検出用キットや、（8）未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上のモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする上

記(7)記載の卵白アレルゲン検出用キットや、(9)未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボアルブミンモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(7)又は(8)記載の卵白アレルゲン検出用キットや、(10)未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体が、抗オボムコイドモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(7)又は(8)記載の卵白アレルゲン検出用キットや、(11)異なるエпитープを認識する2以上のモノクローナル抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(7)～(10)のいずれか記載の卵白アレルゲン検出用キットや、(12)未変性オボアルブミンを認識する1又は2以上のモノクローナル抗体及び変性オボアルブミンを認識する1又は2以上のモノクローナル抗体、並びに、オボムコイドを認識する2以上のモノクローナル抗体を備えることを特徴とする上記(7)～(11)のいずれか記載の卵白アレルゲン検出用キットに関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、食品等に含まれる卵白アレルゲン(抗原)についての免疫学的な検出方法において、卵白アレルゲンが、変性／未変性のいかなる状態にあっても正確に定性かつ定量的に検出することができる。より具体的には、1)原料、或いは製造工程では卵白アレルゲンは変性していないため、未変性オボアルブミン及び／又はオボムコイドを認識するモノクローナル抗体により被検体中の卵白アレルゲンを検出することが可能である。2)攪拌など製造工程中に卵白タンパク質の立体構造が一部変化した場合には、未変性オボアルブミンやオボムコイドを認識するモノクローナル抗体の一部あるいは全てが反応するとともに、変性オボアルブミンやオボムコイドを認識するモノクローナル抗体も一部反応することから被検体中のアレルゲンが検出可能である。3)食品中で加熱変性し、不溶化したアレルゲンをより正確に検出するために、たんぱく質変性剤(尿素、SDS、2-メルカプトエタノール)で可溶化した場合にでも変性オボアルブミンを認識するモノクローナル抗体により被検体中の卵白アレルゲンを検出することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の卵白アレルゲンの検出方法としては、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体(以下、これら2種のモノクローナル抗体を「抗未変性／変性卵白アレルゲンMAb」ということがある)とを併用する卵白アレルゲンの免疫学的な検出方法であれば特に制限されず、また、本発明の卵白アレルゲン検出用キットとしては、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを備え、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを併用する条件下で用いられる免疫学的なアレルゲン検出用キットであれば特に制限されず、ここで「卵白アレルゲン」とは、オボアルブミン及び／又はオボムコイドを意味し、また「未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体とを併用する」とは、未変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体と、変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体との共存下(混合した状態で)、ほぼ同時に卵白アレルゲンとの反応に供することをいう。上記抗未変性／変性卵白アレルゲンMAbとしては、未変性／変性オボアルブミンを認識する抗未変性／変性オボアルブミンMAbの組合わせや、未変性／変性オボムコイドを認識する抗未変性／変性オボムコイドMAbの組合わせや、未変性オボアルブミンと変性オボムコイドを認識する抗未変性オボアルブミンMAbと変性オボムコイドMAbの組合わせや、未変性オボムコイドと変性オボアルブミンを認識する抗未変性オボムコイドMAbと変性オボアルブミンMAbの組合わせを例示することができる。また、上記免疫学的な卵白アレルゲンの検出方法は、未変性／変性卵白アレルゲンを含む試料を、標識化した抗未変性／変性卵白アレルゲンMAbと接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に抗未変性／変性

卵白アレルゲンMA bと接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて分離・測定する検出段階とからなり、かかる免疫反応段階における抗原抗体反応の方法も特に制限されず、例えば、以下の方法を例示することができる。

【0012】

不溶性担体に結合した抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bに試料中の卵白アレルゲンを捕捉させた後に標識化抗IgG抗体を反応させるサンドイッチ法や、不溶性担体に結合した抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bと異なるエピトープを認識する標識化抗未変性／変性卵白アレルゲンMA b（第二抗体）を用いるサンドイッチ二抗体法や、不溶性担体に結合した抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bに試料中の卵白アレルゲンを標識化抗原の存在下で反応させる競合法や、卵白アレルゲンを含有する試料にこれらと特異的に反応する磁気ビーズ結合標識化抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bを作用させさせた後、磁力により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する磁気ビーズ法や、卵白アレルゲンを含有する試料にこれらと特異的に反応する標識化抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bを作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法や、金コロイド等で標識された抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bと卵白アレルゲンが結合した抗原抗体複合体が試験ストリップ上を毛管現象等により移動する途中に、卵白アレルゲンと結合する抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bをあらかじめ固定しておき、抗原抗体複合体を補足させることで現れる着色ラインの有無によって定性分析するイムノクロマト法その他、二重免疫拡散法、放射免疫拡散法など公知の免疫測定法を利用することができるが、未変性卵白アレルゲン及び／又は変性卵白アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上のモノクローナル抗体を用いる方法、例えば、食品中の未変性オボアルブミン及び／又は変性オボアルブミンが1.0～10.0ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうる高感度の点で、また食品中の未変性オボムコイド及び／又は変性オボムコイドが、10～100ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうる高感度の点で、サンドイッチ二抗体法が、定性的には簡便性からイムノクロマト法が好ましい。

【0013】

上記抗原抗体反応において用いられる不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等を挙げることができ、また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管、ラテックスビーズ状等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は特に限定されるものでなく、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【0014】

本発明の卵白アレルゲンの検出方法や卵白アレルゲン検出用キットに用いられる抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bの免疫グロブリンのクラス及びタイプは特に制限されないが、抗オボアルブミンMA bや抗オボムコイドMA bとして、IgGクラス、タイプ κ の抗体が好適に用いられる。また、モノクローナル抗体の形態としては、全抗体又はF(a b')₂、Fab等の断片を用いることもできる。抗体の由来は特に限定されるものではないが、マウス、ラット、ヒト、兎、羊、山羊、鶏等を挙げることができるが、作製の簡便性からマウスに由来するモノクローナル抗体が好適に用いられる。また、抗未変性／変性卵白アレルゲンMA bは、未変性又は変性卵白アレルゲンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造することができる。

【0015】

抗未変性／変性卵白アレルゲンMA b産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び／又

は変性卵白アレルゲンを用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの抗体産生細胞とマウスミエローマ細胞とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗未変性／変性卵白アレルゲンMAb産生ハイブリドーマを作出することができる。上記の抗体産生細胞としては、例えば未変性及び／若しくは変性卵白アレルゲン又はこれを含有する組成物を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等を挙げることができる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えば未変性及び／又は変性卵白アレルゲンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に1～2回／月、1～6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2～4日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0016】

細胞融合は、例えばダルコッペ改変イーグル培地(DMEM)等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在下で混合することにより行なうことができる。細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択し、次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗未変性／変性卵白アレルゲンMAbを産生するハイブリドーマを得ることができる。また、未変性卵白アレルゲンのみを用いて免疫した抗免疫動物から、有利に抗変性卵白アレルゲンMAbを得ることができる。この場合、抗変性卵白アレルゲンMAb産生ハイブリドーマをスクリーニングしてもよいし、あるいは、固相状態でのELISAで未変性卵白アレルゲンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、この抗体産生ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体から液相状態で未変性卵白アレルゲンに対してのみ特異的に反応する抗変性卵白アレルゲンMAbを得ることができる。前記のように、抗体産生ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取することができるが、培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、例えば、IgG精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

【0017】

また、標識化抗体作製に用いられる標識物質としては、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質であればよく、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、金コロイド等を使用するのができ、酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等を、蛍光物質としては、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等を、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等を、放射性物質としては ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等を例示することができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、発光剤等が用いることができる。

【0018】

本発明の卵白アレルゲンの検出方法や卵白アレルゲン検出用キットの対象となるアレルゲンとしては、前記のようにオボアルブミン及び／又はオボムコイドであれば特に制限されないが、上記抗未変性／変性卵白アレルゲンMAbの作製に用いられる免疫源としてのオボアルブミンやオボムコイドとしては、未変性の食品中のオボアルブミンやオボムコイ

ド及び加熱等により変性処理した食品中のオボアルブミンやオボムコイドを挙げることができるが、オボアルブミンやオボムコイドの変性処理として、変性処理後の時間が経過した場合にも変性状態を保つことができる還元カルボキシメチル化処理が好ましい。

【0019】

本発明の卵白アレレルゲン検出用キットには、有効成分としての抗未変性／変性卵白アレレルゲンMA b、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗未変性／変性卵白アレレルゲンMA b、特に好ましくは未変性オボアルブミンを認識する1又は2以上のモノクローナル抗体及び変性オボアルブミンを認識する1又は2以上のモノクローナル抗体、並びに、オボムコイドを認識する2以上のモノクローナル抗体を含むが、これらは保存安定性の点から、溶液状態よりも凍結乾燥物として収容されていることが好ましく、検出用キットにはかかる抗未変性／変性卵白アレレルゲンMA b溶解する緩衝液や培養液の他、試料を調製するための緩衝液等を含んでいてもよい。また、より好ましい別の態様の本発明の卵白アレレルゲン検出用キットとしては、前記イムノクロマト法における試験ストリップを挙げることができる。

【0020】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、実施例においては、モノクローナル抗体をMA bと表記する。

【実施例1】

【0021】

[変性／未変性オボアルブミンに結合可能なMA bの確立]

1. 材料及び方法

1) ニワトリオボアルブミン（以下「OA」という）の調製

新鮮なニワトリ卵より卵白のみを採取し、泡立てないように均質化後、等量の飽和硫酸アンモニウムを加え、濾紙No. 1（アドバンテック東洋）で濾過した。そして、得られたろ液に0.5Mの硫酸を添加しpH4.6に調整後、一晚放置した。8,000rpm×20分の遠心分離により得られた沈殿を蒸留水に溶解し、同じ方法で再結晶化し、粗OA画分を得た。粗OAはさらに、TSK gel DEAE 650S（Tosoh）を用いたイオン交換クロマトグラフィにより精製した。移動相には50mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH6.4）を用い、NaClの0から0.3MのリニアグラジェントによりOAを分画し、透析による脱塩後、凍結乾燥を行った。この凍結乾燥OAを用い、生理食塩水で0.1%のOA溶液を作製し、1ml容エッペンドルフチューブに500μlずつ分注して抗原溶液とし、免疫に供するまで-20℃で凍結保管した。

【0022】

2) 免疫

供試動物として、6週齢のBALB/cマウス（日本クレア株式会社製）4尾を用いた。初回免疫には、完全フロイントアジュバント（Difco）を0.1%のOAが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。また、追加免疫は、3週間の間隔で2回行った。免疫には、不完全フロイントアジュバント（Difco）を0.1%のOAが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。なお、抗変性OAMA bを得る場合、最終免疫のみに後述する還元カルボキシメチル化OAを用いた。

【0023】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫でOAを注射した1週間後に、各BALB/cマウスの尾部静脈より採血を行った。採血した血液は室温に2時間放置後、遠心分離を行い、血清を得た。これらの血清の10倍希釈段を作製し、非競合法ELISAによりマウス血中の抗OA抗体価を調べた。なお、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG（H+

L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 製) を用いた。

【0024】

4) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法 (1975)) に従った。すなわち、十分に抗体価が上がったマウスに、0.1% OA 溶液 100 μ l を尾部静脈より注射した。静脈注射から4日後、マウスより脾臓を無菌的に摘出した。脾臓を細切後、RPMI 1640 で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ (Cell Strainer, 70 mm, Becton Dickinson) を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1,000 rpm \times 10 分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度 RPMI 1640 で再懸濁し細胞数をカウントした。この脾臓細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) 懸濁液を細胞数が 10:1 になるように混合し、再度 1,000 rpm \times 10 分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量 3,350 の 45% ポリエチレングリコールを滴下し細胞融合を行った。細胞溶液に RPMI 1640 を加え希釈後、遠心分離でペレットにした。このペレットに、ハイブリドーマ用培地 (10% 牛胎児血清、40 mM の 2-メルカプトエタノール、100 U/ml のペニシリン、100 mg/ml のストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地) に 100 μ M のヒポキサンチン、0.4 μ M のアミノプテリン、16 μ M のチミジンを含む HAT 選択培地を加え、 5×10^6 cells/well となるように 24 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に分注し、5% CO₂ 下 37℃ で培養した。

【0025】

5) 限界希釈法によるクローニング

細胞培養用プレートの各ウェルの培養上清について、ELISA の一次抗体として供試し、抗 OA 抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。ELISA により OA に対して陽性を示したウェルのハイブリドーマについて、0.9 cell/well となるように 96 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に移し、限界希釈法によるクローニングを行った。なお、フィーダー細胞として、4 週齢 BALB/c マウス胸腺細胞を 5×10^6 cells/well となるように 96 ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに加えた。クローニングされたハイブリドーマの培養には、10% 牛胎児血清、40 mM の 2-メルカプトエタノール、100 U/ml のペニシリン、100 mg/ml のストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地を用いた。

【0026】

6) 抗体のスクリーニング

モノクローナル抗体のスクリーニングは、未変性 OA (以下「NOA」という) あるいは還元カルボキシメチル化 OA (以下「RCMOA」という) に対する反応性の違いを調べることで特異性の異なるクローンを得ることとした。RCMOA は、精製 OA (上記凍結乾燥物) を 10 mg 量り、1.4 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) 1 ml、5% の EDTA 100 μ l、1.2 g の尿素、33 μ l の 2-メルカプトエタノールを加え 2.5 ml に定容した後、窒素ガス置換を行い、37℃、1 時間の還元処理を行った。さらに、1 M の NaOH 300 μ l に溶解した 89 mg のモノヨード酢酸を加え窒素ガス置換した後、室温で 1 時間のカルボキシメチル化を行い、RCMOA とした。培養上清の NOA あるいは RCMOA に対する反応性を非競合法 ELISA により調べた。

【0027】

7) 腹水の採取及び MA b の精製

Jones ら (1990) に従い、まず、BALB/c マウスに不完全フロイントアジュバントを 0.2 ml 腹腔内に注射した。1 週間後、一尾当たり 5×10^6 cells のクローニングされたハイブリドーマを接種した。腹水貯留後、シリンジにより腹水を採取した。採種した腹水を Protein G カラム (アマシャム ファルマシア) により精製した。

【0028】

8) MA b の特性と MA b のクラス、サブクラス及びタイプ

抗 OAMA b の特性を決定するために、固相法と液相法を用いた。固相法として、NOA 又は RCMOA をあらかじめ細胞培養用プレートのウェル内に固定し、この固定化され

た抗原（NOA又はRCMOA）に抗未変性／変性OAMAbを作用させる方法を用い、また、液相法として、ウサギ抗OAポリクローナル抗体をあらかじめ細胞培養用プレートウェル内に固定し、このポリクローナル抗体にNOA又はRCMOAを結合させた状態で、抗未変性／変性OAMAbを作用させる方法を用いた。また、MAbのクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immunoglobulin isotyping kit (Pharmingen) により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL(k)及びIgL(g)を決定した。

【0029】

9) MAbのビオチン化

精製したMAbについて、サンドイッチELISAに供試するため、それぞれビオチン処理を行った。50mMの炭酸緩衝液（pH8.5）を用いて20mg/mlとなるよう調製し、DMSOに3mg/100 μ lで溶解したNHS-ビオチン溶液を10 μ l加え、攪拌後、氷冷しながら2時間静置した。その後、20mg/mlとなるようにPBSで置換した。

【0030】

2. 結果

1) 抗OAMAbの特性とクラス、サブクラス

NOAに対する特異性を持つMAb8種類、及び、RCMOAに対する特異性を持つMAb8種類を得た。それぞれ液相あるいは固相の抗原に対する特異性を表1に示した。

【0031】

【表1】

MAb名	固相 NOA	液相 NOA	固相 RCMOA	液相 RCMOA	クラス、サブクラスおよびタイプ
301B5	+	+	-	-	IgG1 (κ)
304E4	+	+	-	-	IgG1 (κ)
305G5	+	+	-	-	IgG1 (κ)
307G4	+	-	-	-	IgG1 (κ)
310G7	+	+	-	-	IgG1 (κ)
311E11	+	-	-	-	IgG1 (κ)
314E12	+	+	-	-	IgG1 (κ)
316G1	+	+	-	-	IgG1 (κ)
63E5	+	-	+	+	IgG1 (κ)
65F2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
68G4	+	-	+	+	IgG1 (κ)
69H6	+	-	+	+	IgG1 (κ)
74G2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
115F8	+	-	+	+	IgG1 (κ)
117F9	+	-	+	+	IgG1 (κ)
119D11	+	-	+	+	IgG1 (κ)

【0032】

2) 組合せ条件

NOAを検出するためのMAbあるいはRCMOAを検出するためのMAbの組合せは、サンドイッチELISAにおける検出感度の点から選出した。その結果、NOAでは301B5と316G1、RCMOAでは117F9と119D11を高い組合せとして選択した。

【実施例2】

【0033】

[サンドイッチELISAによる変性及び未変性抗原の検出]

1. 材料及び方法

NOA溶液は、精製OAをPBSで100ppb溶液となるように調製し、3倍の希釈段を作製した（希釈段A）。一方、ガラス試験管に精製OAを1mg量り、6gの尿素、0.2mlの2-メルカプトエタノール、1mlの50mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.6）、1.5mlの蒸留水を加え、アルミフォイルで蓋をした後、100℃で1時間オイルバスで加熱、変性処理を行った。冷却後、100ml容メスフラスコに移し、PBSで100mlにメスアップした。これをさらにPBSで100倍希釈し、尿素変性OA（以下「UDO A」という）100ppb溶液とした。さらに尿素濃度を0.01Mに保ちながら3倍の希釈段を作製した（希釈段B）。また、NOA100ppb溶液とUDO A100ppb溶液を等量ずつ混ぜ（NOA及びUDO Aは各50ppb溶液となる）、尿素濃度を0.005Mに保ちながら3倍の希釈段を作製した（希釈段C）。また、サンドイッチELISAに供試した条件を表2に示す。コーティングMAb濃度は単独の場合は25μg/mlに、また混合した場合には各12.5μg/mlとし、合計で25μg/mlとなるようにした。

【0034】

【表2】

試験 No.	コーティング MAb	抗原	二次抗体
試験 1	301B5	希釈段 A (未 変 性)	316G1 と 117F9 の混合
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		
試験 2	301B5	希釈段 B (変性)	
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		
試験 3	301B5	希釈段 C (未変性 +変性)	
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		

【0035】

2. 結果

図1に示すように、未変性OAを対象とした（試験1）では301B5単独と、301B5と119D11の混合の曲線はほとんど重なったが、10ppb以下のより希薄な状態において301B5単独よりも301B5と119D11の混合の曲線では若干混合の方が吸光値は高く、検出感度が上げられる可能性が考えられた。また、変性OAを対象とした（試験2）のUDO Aでは、301B5単独では吸光値が認められず、301B5及び316G1はUDO Aに関与しないものと考えられたが、119D11単独と301B5と119D11の混合の曲線では明らかに混合の方が吸光値は高く、MAbを混合することにより検出感度を上げることができるものと考えられた（図2）。これは未変性/変性OAを対象とした（試験3）でも認められ、301B5単独よりも301B5と119D11の混合の方が明らかに吸光値が高かった（図3）。試験1～3のいずれの場合も、単独でコーティングされた抗体濃度は25g/mlであり、混合ではそれぞれ半分の濃度の12.5mg/mlであったことから、MAbの種類を増やす混合系を用いることで、抗体濃度が同じあるいは少なくとも、より抗原の検出感度を上げることが可能であることが明らかとなった。

【実施例3】

【0036】

[イムノクロマトによる変性及び未変性OAの検出]

1. 材料及び方法

1) 金コロイド標識及びコンジュゲートパッドの作製

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/ml となるように 119D11 及び 316G1 の MA b 単独あるいは混合溶液を調製した。あらかじめ 0.2 M 炭酸カリウム溶液で pH 9.0 に調製した金コロイド溶液 (シグマ社製) 5 ml に MA b 溶液を 500 μ l 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液を 625 μ l を加え、さらに 15 分間反応させた。遠心分離を行い、1% BSA 溶液で OD 525 = 1.0 になるよう調製した。ガラスウール製コンジュゲートパッド (日本ミリポア社製) に 68 μ l/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

【0037】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBS で 4 mg/ml となるよう 117F9 及び 301B5 の MA b 単独あるいは混合溶液を調製し、ニトロセルロースメンブレンに直線状に塗布し乾燥させた。その後、1% BSA、0.1% Tween 20 を含む PBS で 37℃、2 時間ブロッキング後、PBS で洗浄し乾燥させた。

【0038】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したコンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレンに加えて、被検液スポット用のガラスウール製サンプルパッド、被検液吸収用のガラスウール製吸収パッドを別途用意し、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレン、吸収パッドの順にそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。被検液としては、実施例 2 で調製した NOA 並びに UDOA を適宜希釈して用いた。

【0039】

2. 結果

301B5 及び金コロイド標識 316G1 の組合せにより NOA は 10 ppb まで検出することができたが、UDOA は 1 ppm でも検出できなかった。一方、117F9 及び金コロイド標識 119D11 の組合せにより、UDOA は 10 ppb まで検出することができたが、NOA は 1 ppm でも検出できなかった。これに対して、301B5 及び 117F9 の固定化抗体混合物、並びに 316G1 及び 119D11 の金コロイド抗体混合物を用いたイムノクロマトストリップを作製した場合、変性 OA あるいは未変性 OA を 10 ppb まで検出可能であった。この様に変性 OA に結合可能な MA b と未変性 OA に結合可能な MA b を組み合わせることにより、製造工程中に混入した未変性卵白が対象となっても、加熱後の製品が対象となっても、いかなる場合にでも対応できるイムノクロマトストリップの設計が可能となった。

【0040】

市販の卵アレルギー検出用イムノクロマトストリップでは、ブランクとして 0.01 M の尿素のみを含む PBS を滴下したところ、非特異的なバンドが生じてしまい、擬陽性となってしまった。これでは卵白アレルギー検査において、熱などにより不溶化した卵白アレルギーを抽出するためのたんぱく質変性剤である尿素を使用できず、アレルギーとして検出できる対象が極めて狭い範囲に限られてしまう危険性が考えられた。

【実施例 4】

【0041】

[変性/未変性オボムコイドに結合可能な MA b の確立]

1. 材料及び方法

1) ニワトリオボムコイド (以下「OM」という) の調製

新鮮なニワトリ卵より卵白のみを採取し、泡立てないように均質化後、等量の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.8) と混合した。さらに 0.1 M 酢酸緩衝液に対し透析後、8,000 rpm \times 20 分遠心し、上清を回収した。さらに、TSK gel DEAE 650S (Tosoh) を用いたイオン交換クロマトグラフィにより精製した。移動相には 50 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 6.4) を用い、NaCl の 0 から 0.3 M のリニアグラジェントにより

OMを分画し、透析による脱塩後、凍結乾燥を行った。この凍結乾燥OMを用い、生理食塩水で0.1%のOM溶液を作製し、1ml容エッペンドルフチューブに500 μ lずつ分注して抗原溶液とし、免疫に供するまで-20℃で凍結保管した。

【0042】

2) 免疫

供試動物として、6週齢のBALB/cマウス（日本クレア株式会社製）4尾を用いた。初回免疫には、完全フロイントアジュバント（Difco）を0.1%のOMが500 μ l入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150 μ l腹腔内に注射した。また、追加免疫は、3週間の間隔で2回行った。免疫には、不完全フロイントアジュバント（Difco）を0.1%のOMが500 μ l入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150 μ l腹腔内に注射した。

【0043】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫でOMを注射した1週間後に、各BALB/cマウスの尾部静脈より採血を行った。採血した血液は室温に2時間放置後、遠心分離を行い、血清を得た。これらの血清の10倍希釈段を作製し、非競合法ELISAによりマウス血中の抗OM抗体価を調べた。なお、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG（H+L）抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 製）を用いた。

【0044】

4) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法（1975）に従った。すなわち、十分に抗体価が上がったマウスに、0.1%OM溶液100mlを尾部静脈より注射した。静脈注射から4日後、マウスより脾臓を無菌的に摘出した。脾臓を細切後、RPMI 1640で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ（Cell Strainer, 70 mm, Becton Dickinson）を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1,000rpm \times 10分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度RPMI 1640で再懸濁し細胞数をカウントした。この脾臓細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞（P3X63Ag8.653）懸濁液を細胞数が10:1になるように混合し、再度1,000rpm \times 10分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量3,350の45%ポリエチレングリコールを滴下し細胞融合を行った。細胞溶液にRPMI 1640を加え希釈後、遠心分離でペレットにした。このペレットに、ハイブリドーマ用培地（10%牛胎児血清、40mMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地）に100 μ Mのヒポキサンチン、0.4 μ Mのアミノプテリン、16 μ Mのチミジンを含むHAT選択培地を加え、5 \times 10⁶cells/wellとなるように24ウェルの細胞培養用プレート（Becton Dickinson）に分注し、5%CO₂下37℃で培養した。

【0045】

5) 限界希釈法によるクローニング

細胞培養用プレートの各ウェルの培養上清について、ELISAの一次抗体として供試し、抗OM抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。ELISAによりOMに対して陽性を示したウェルのハイブリドーマについて、0.9cell/wellとなるように96ウェルの細胞培養用プレート（Becton Dickinson）に移し、限界希釈法によるクローニングを行った。なお、フィーダー細胞として、4週齢BALB/cマウス胸腺細胞を5 \times 10⁶cells/wellとなるように96ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに加えた。クローニングされたハイブリドーマの培養には、10%牛胎児血清、40mMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100g/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地を用いた。

【0046】

6) 腹水の採取及びMAbの精製

Jonesら(1990)に従い、まず、BALB/cマウスに不完全フロイントアジュバントを0.2ml腹腔内に注射した。1週間後、一尾当たり 5×10^6 cellsのクローニングされたハイブリドーマを接種した。腹水貯留後、シリンジにより腹水を採取した。採種した腹水をProtein G カラム(アマシャム ファルマシア)により精製した。

【0047】

7) MA bの特性とMA bのクラス、サブクラス及びタイプ

抗OMMA bの特性を決定するために、固相法と液相法を用いた。固相法として、OMをあらかじめ細胞培養用プレートのウェル内に固定し、この固定化されたOMにMA bを作用させる方法を用い、また、液相法として、ウサギ抗オボムコイドポリクロナール抗体をあらかじめ細胞培養用プレートのウェル内に固定し、このポリクロナール抗体にOMを結合させた状態で、MA bを作用させる方法を用いた。また、MA bのクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immunoglobulin isotyping kit (Pharmingen) により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL(k)及びIgL(g)を決定した。

【0048】

8) MA bのビオチン化

精製したMA bについて、サンドイッチELISAに供試するため、それぞれビオチン処理を行った。50mMの炭酸緩衝液(pH8.5)を用いて20mg/mlとなるよう調製し、DMSOに3mg/100 μ lで溶解したNHS-ビオチン溶液を10ml加え、攪拌後、氷冷しながら2時間静置した。その後、20mg/mlとなるようにPBSで置換した。

【0049】

2. 結果

1) 抗OMMA bの特性とクラス、サブクラス

OMに対する特異性を持つMA b 8種類を得た。それぞれ液相あるいは固相の抗原に対する特異性を表3に示した。

【0050】

【表3】

MAb 名	固 相 OM	液 相 OM	クラス、サブクラスおよびタイプ
47E5	+++	++	IgG2a (κ)
50A12	+++	++	IgG1 (κ)
52C6	+	+	IgG1 (κ)
53E11	++	-	IgG1 (κ)
56E4	+	+	IgM (κ)
57G12	+	-	IgM (κ)
60C11	+	-	IgG1 (κ)

【0051】

2) 組合せ条件

OMを検出するためのMA bの組合せは、サンドイッチELISAにおける検出感度の点から選出した。その結果、47E5と50A12を高い組合せとして選択した。

【実施例5】

【0052】

[イムノクロマトによるOMを指標とした卵白の検出]

1. 材料及び方法

1) 金コロイド標識及びコンジュゲートパッドの作製

2mMホウ酸緩衝液(pH9.0)で1mg/mlとなるように47E5のMA b溶液

を調製した。あらかじめ 0.2 M 炭酸カリウム溶液で pH 9.0 に調製した金コロイド溶液（シグマ社製）5 ml に MA b 溶液を 500 μ l 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液を 625 μ l を加え、さらに 15 分間反応させた。遠心分離を行い、1% BSA 溶液で OD 525 = 1.0 になるよう調製した。ガラスウール製コンジュゲートパッド（日本ミリポア社製）に 68 μ l / cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

【0053】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBS で 4 mg/ml となるよう 50A12 の MA b 溶液を調製し、ニトロセルロースメンブレンに直線状に塗布し乾燥させた。その後、1% BSA、0.1% Tween 20 を含む PBS で 37℃、2 時間ブロッキング後、PBS で洗浄し乾燥させた。

【0054】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したコンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレンに加えて、被検液スポット用のガラスウール製サンプルパッド、被検液吸収用のガラスウール製吸収パッドを別途用意し、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレン、吸収パッドの順にそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。被検液としては、凍結乾燥卵白粉末の 0.1% 溶液をそれぞれ室温、50℃、75℃、100℃で 1 時間処理したものを適宜希釈して用いた。

【0055】

2. 結果

47E5 及び金コロイド標識 50A12 の組み合わせにより、室温及び 50℃で 1 時間処理した卵白溶液は 10 ppb まで検出できた。また、75、100℃で 1 時間処理した卵白は、100 ppb まで検出することができた。この結果から、100℃で 1 時間に相当する加熱処理をされた食品では、実施例 3 で示した尿素の様な変性剤を用いなくても、この抗 OMMA b のイムノクロマトストリップを用いることで、卵白として 100 ppb までは、簡便な抽出により検出可能であった。しかし、100℃を越えた熱処理では OM のイムノクロマトでは検出できないため、実施例 3 で示した尿素による可溶化処理が必要であった。

【実施例 6】

【0056】

[抗 OAMA b と抗 OMMA b との併用効果]

実施例 3 及び 5 の結果より、301B5、117F9 及び 47E5 の固定化抗体混合物、並びに 316G1、119D11 及び 50A12 の金コロイド抗体混合物を用いたイムノクロマトストリップを実施例 3 あるいは 5 に従い作製し、卵白の検出を試みた。

【0057】

2. 結果

301B5 と 316G1、117F9 と 119D11 および 47E5 と 50A12 の組み合わせは、それぞれ実施例 3 あるいは 5 に示したように目的の変性／未変性 OA あるいは OM をそれぞれの感度で検出することが可能であった。このことから、加工食品の製造過程において未加熱状態の場合には未変性 OA 及び OM に対する MA b が反応し、50 から 100℃の場合には、未変性／変性 OA、及び OM に対する MA b が反応、それ以上の場合には尿素による可溶化処理により変性 OA が反応する卵白の検出方法を開発することができた。


【図面の簡単な説明】

【0058】

【図 1】本発明の試験 1 における各希釈段に対する抗オボアルブミン MA b の反応性を示す図である。

【図 2】本発明の試験 2 における各希釈段に対する抗オボアルブミン MA b の反応性を示す図である。

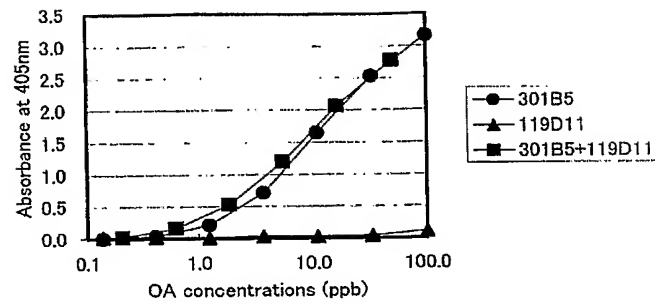
【図 3】本発明の試験 3 における各希釈段に対する抗オボアルブミン MA b の反応性を示す図である。



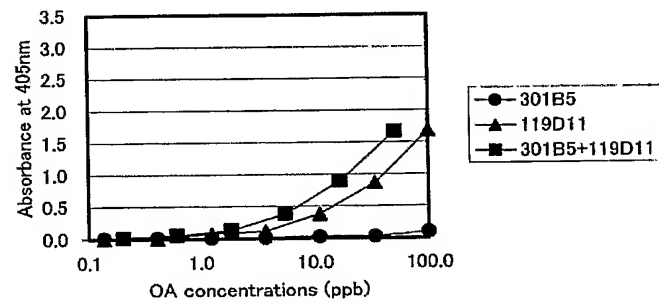
を示す図である。

【書類名】 図面

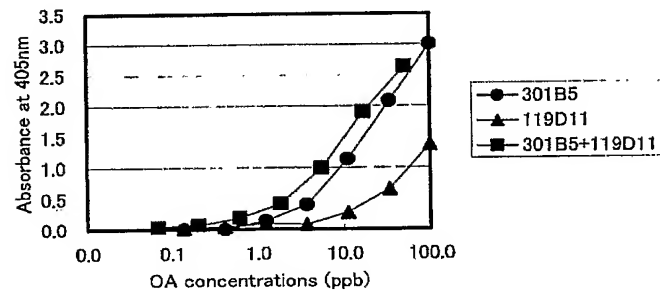
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 卵白を含む食品において、アルゲンとなるオボアルブミンやオボムコイドが変性／未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キットを提供すること。

【解決手段】 精製卵白アレルゲンに対するモノクローナル抗体（MA b）を作出し、その中から未変性卵白アルゲンに結合できるMA bと、変性卵白アルゲンに結合できるMA bとをそれぞれ複数選択し、未変性卵白アルゲンMA b群と変性卵白アルゲンMA b群を組み合わせることで、抗原となる卵白アルゲンが変性／未変性のいかなる状態にあっても高感度で検出でき、特に未変性卵白アルゲンMA b群と変性卵白アルゲンMA b群を組み合わせる場合、未変性卵白アルゲンあるいは変性卵白アルゲンのみが存在する場合であっても、未変性卵白アルゲンMA b（群）単独使用や変性卵白アルゲンMA b（群）単独使用におけるよりも優れた検出感度で検出しうる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-063071
受付番号	50400371616
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成 16 年 3 月 8 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000113067
【住所又は居所】	東京都品川区東大井 3 丁目 17 番 4 号
【氏名又は名称】	プリマハム株式会社

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】	100102255
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】	100118957
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	岡 晴子

【選任した代理人】

【識別番号】	100123168
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	大▲高▼ とし子

【選任した代理人】

【識別番号】	100120086
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	▲高▼津 一也

特願 2 0 0 4 - 0 6 3 0 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 1 3 0 6 7]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都品川区東大井 3 丁目 1 7 番 4 号

氏 名

プリマハム株式会社